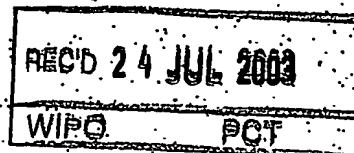




**Ministero delle Attività Produttive**  
**Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività**  
**Ufficio Italiano Brevetti e Marchi**  
**Ufficio G2**



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2002A000604 DEL 29/11/2002

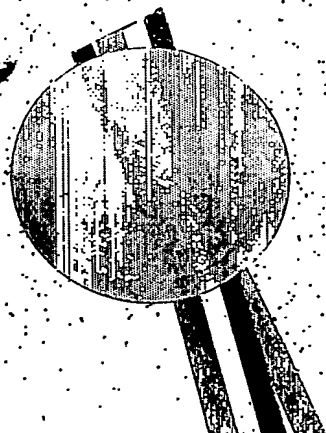


*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, 11

1 LUG. 2003



IL DIRIGENTE  
*Maria Roberta Pasi*  
 Dr.ssa Maria Roberta Pasi

## AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (1)

1) Denominazione **S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI**  
 Residenza **TRIESTE - IT** codice \_\_\_\_\_  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **CAPASSO Olga, DE SIMONE Domenico e FIORUZZI Maria Augusta**  
 denominazione studio di appartenenza **DE SIMONE & PARTNERS SPA**  
 via **Vincenzo Bellini** n. **20** città **ROMA** cap **00198** (prov) **RM**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario **Vedi sopra.**

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez./cl./sc.) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

**"METODO PER IL PROCESSAMENTO DI IMMAGINI CON COLTURE DI NEURONI E  
 DISPOSITIVO PER LA SUA ATTUAZIONE".**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **RUARO, Maria Elisabetta** 3) **TORRE, Vincent**  
 2) **BONIFAZI, Paolo** 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1) **Nessuna.** \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_

## SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**Nessuna.**

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ **PROV** n. pag. **25** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
 Doc. 2) ☒ **PROV** n. tav. **04** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
 Doc. 3) ☒ **RIS** **dichiarazione sostitutiva della** \_\_\_\_\_  
 Doc. 4) ☒ **RIS** **lettera d'incarico, autorizzazione o atto di cessione** \_\_\_\_\_  
 Doc. 5) ☒ **RIS** **designazione inventore** \_\_\_\_\_  
 Doc. 6) ☒ **RIS** **documenti di priorità con traduzione in italiano** \_\_\_\_\_  
 Doc. 7) ☒ **RIS** **autorizzazione o atto di cessione** \_\_\_\_\_  
 Doc. 7) ☒ **RIS** **nominativo completo del richiedente** \_\_\_\_\_

8) attestati di versamento, totale

**Euro 291,80.=**COMPILATO IL **29/11/2002**

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE (1)

**CAPASSO Olga**

obbligatorio

CONTINUA SINO **NO****della DE SIMONE & PARTNERS SPA**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO **SI**

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA, ROMA

**RM 2002 A 000604**codice **58**

## VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno

**DUEMILADUE**

il giorno

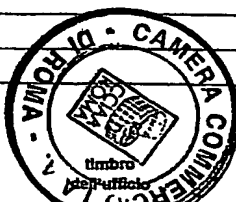
**VENTINOVE**

del mese di

**NOVEMBRE**Il (1) richiedente (1) sopraindicato (1) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

**RM 2002 A 000604**

REP. A

DATA DI DEPOSITO

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

**S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI**

Residenza

**Via Beirut 2-4 - 34014 TRIESTE / IT**

D. TITOLO

**"METODO PER IL PROCESSAMENTO DI IMMAGINI CON COLTURE DI NEURONI E DISPOSITIVO PER LA SUA ATTUAZIONE".**

Classe proposta (sez./d./scd/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritto un metodo per il processamento di immagini con colture di neuroni e un dispositivo per la sua attuazione.

M. DISEGNO



**RM 2002 A 000604**

## DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "Metodo per il processamento di immagini con colture di neuroni e dispositivo per la sua attuazione"

a nome: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

inventori: Maria Elisabetta Ruaro, Paolo Bonifazi e Vincent Torre

\* \* \*

La presente invenzione concerne un metodo per il processamento di immagini con colture di neuroni e un dispositivo per la sua attuazione.

I dispositivi standard al silicio per computer stanno raggiungendo misure sempre più piccole. Per incrementare il potere di elaborazione dei computer attuali, è necessario sviluppare nuovi dispositivi. Sono già stati costruiti dispositivi che contengono molecole organiche<sup>1-6</sup> di dimensioni inferiori al nanometro. Essi risolvono, molto efficacemente, problemi seriali ma, nonostante la loro considerevole velocità, sono meno indicati per risolvere problemi di parallelismo massivo, come quelli inerenti all'intelligenza artificiale, alla visione artificiale ed alla robotica<sup>7-8</sup>. Tali dispositivi sono meno indicati per parallelismi massivi, a causa della difficoltà a formare le numerose connessioni tra le varie unità di calcolo, per le quali invece i neuroni biologici sono ideali. Il cervello umano risolve questi problemi, usando elementi di calcolo lenti e spesso inaffidabili<sup>9-11</sup>, ovvero i neuroni, che però operano naturalmente in parallelo. Sono anche stati sviluppati strumenti ibridi, composti da neuroni biologici ed elementi di metallo e/o silicio<sup>12-19</sup>, con lo scopo di ottenere neurocomputers, mezzi ideali per risolvere i problemi di parallelismo massivo.

Gli autori della presente invenzione hanno sorprendentemente trovato che, attraverso la mappatura di immagini in colture di neuroni cresciute su "array" o matrici di multielettrodi disponibili commercialmente (MEA), e' possibile elaborare in pochi secondi immagini digitali, indipendentemente dalla loro dimensione, contrariamente a quanto avviene nei computer seriali convenzionali. L'invenzione mostra la fattibilità e l'utilità dei neurocomputer e stabilisce la base per una nuova generazione di strumenti per computer.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un dispositivo per il processamento in parallelo di immagini comprendente almeno una "multi electrode array" MEA, su cui è cresciuta una coltura omogenea di cellule neuronali. La MEA viene utilizzata sia per la stimolazione dei neuroni sia per la registrazione della loro attività elettrica.

E' oggetto dell'invenzione un metodo per il processamento in parallelo di un'immagine digitale comprendente le seguenti fasi:

a) mappatura di una immagine digitale ( $I_{1,2}(x,y)$ ) (INPUT) con 1 o 2 bit di risoluzione ( $I_1(x,y)$  o  $I_2(x,y)$ ) a seconda che si abbia un'immagine rispettivamente di 1 o 2 bit) di  $N \times N$  pixel in impulsi di voltaggio di 2 o 4 livelli di intensità applicati ad una matrice  $N \times N$  di elettrodi integrati su un piattino (MEA) su cui sono mantenute in coltura cellule neuronali connesse spontaneamente fra loro a formare una rete;

b) elaborazione dell'immagine da parte della coltura neuronale con il nucleo o kernel di convoluzione:

$$h(\rho, \sigma, t) = A(t) \exp((\rho - \rho(t)) / 2 \sigma(t)^2) \quad (1)$$

$$\rho^2 = x^2 + y^2$$

Questa elaborazione è compiuta dalle connessioni che si stabiliscono tra i neuroni dissociati a seguito della messa in coltura dei neuroni. Questa è una componente essenziale del nuovo dispositivo poichè ne costituisce il meccanismo di calcolo;

c) registrazione dell'attività elettrica della coltura neuronale a mezzo di registrazione con la matrice di multielettrodi dei segnali elettrici (in voltaggio) extracellulari e rivelazione, per ogni singolo elettrodo e in successivi intervalli di tempo, dei segnali o spari associati alla generazione dei potenziali di azione dei neuroni in coltura.

Preferibilmente si registra la frequenza di sparo  $FR(x,y,t)$  (OUTPUT) misurata dall'elettrodo in posizione  $(x,y)$  ed in un intervallo di tempo centrato in  $t$ .

Preferibilmente, la relazione tra INPUT ed OUTPUT sono legati fra loro dall'equazione:

$$FR(x,y,t) = I_{1,2}(x,y) ** h(\rho,\sigma,t) \quad (2)$$

dove  $**$  indica una convoluzione bidimensionale.

L'equazione (2) descrive come è processata una singola immagine digitale di 1 o 2 bit ( $I_{1,2}$ ).

Nel caso in cui l'immagine digitale in INPUT sia definita con 8 bit ( $I_8(x,y)$ ), essa viene scomposta alternativamente in 4 o 8 immagini rispettivamente da 2 o 1 bit ( $I_m$ ) dove  $m$  è uguale rispettivamente a 2 o 1 secondo l'equazione:

$$I_8(x,y) = \sum_{i=1}^{8/m} I_{mi} 2^{m(i-1)} \quad (3)$$

ed ogni singola immagine  $I_{mi}$  viene processata indipendentemente con il metodo sopra descritto. Queste vengono poi ricomposte in una unica

immagine ad 8 bit e l'intero processo (scomposizione, filtraggio, ricomposizione) e' descritto dall'equazione:

$$\sum_{l=1}^{8/m} I_{ml} 2^{m(l-1)} ** h(\rho, \sigma, t) \quad (4)$$

il cui risultato finale è l'immagine  $I_8(x,y)$  processata con una risoluzione ad 8 bit.

L'invenzione verrà ora descritta secondo forme esplicative ma non limitative, facendo riferimento alle seguenti figure:

Figura 1: Mappaggio di un'immagine nella stimolazione di una coltura neuronale. a) immagine digitale binaria 6x10 di una L usata come indice di stimolazione di una coltura neuronale cresciuta su una MEA 6x10 prodotta da MCS. b) coltura neuronale ottenuta dalla dissociazione di neuroni da ippocampo (vedi Metodi). Un ingrandimento della coltura di neuroni sull'area della MEA evidenziata dalle lettere B e C (rettangolo bianco) è mostrata nell'inserito. c) Attività elettrica neurale evocata e registrata dalla MEA. L'elettrodo indicato dalla freccia è stato usato come terra. d) tre registrazioni rappresentative di attività evocata da stimoli di voltaggio di 0.3, 0.6 e 0.9 V. e) AFR (vedi metodi) registrati da un elettrodo rappresentativo (lo stesso usato in d) a stimolazioni differenti di voltaggio, come indicato nel pannello. f) AFR con stimolazioni ripetute a intervalli differenti come indicato nel pannello. Dati ottenuti da 50 diversi esperimenti della stessa stimolazione. Tempo 0 corrisponde all'applicazione della stimolazione. In e e f i conteggi sono stati effettuati su intervalli di 10 millisecondi.

Figura 2. Diffusione dell'eccitazione attraverso la coltura neuronale. a, b, c, d mostrano la AFR negli intervalli di tempo di 1-6, 4-9, 7-12 e 12-17 msec rispettivamente dopo la stimolazione della fila superiore degli elettrodi con un



impulso di voltaggio di 0.6 V. I punti rossi sono i dati sperimentali e linee solide sono le curve teoriche ottenute con l'eq (1). In a e b la curva è stata ottenuta fissando  $\rho$  a 0 e  $\sigma$  rispettivamente a 890 e 1240. In c e d, le curve sono state ottenute fissando  $\rho$  a 920 e 1750 e  $\sigma$  a 980 e 1130 rispettivamente, e-h immagini processate dalla coltura neuronale nei rispettivi intervalli di tempo i-l: filtraggio digitale di un'immagine binaria, da 6x10 pixel, di una barra orizzontale (riga in alto) nei rispettivi intervalli di tempo. Il filtraggio è stato ottenuto con i valori delle curve teoriche riportati in a,b,c,d. AFR in e-l sono rappresentati secondo la mappa di colore (vedi sezione Metodi) riprodotta nella figura.

Figura 3. Riproducibilità del filtraggio dell'immagine da parte della coltura neuronale. A: Attività elettrica neuronale extracellulare registrata da uno stesso elettrodo in risposta a tre identiche stimolazioni. b,c,d,e,f: AFR e CV ottenuti su una finestra di 10 msec corrispondenti agli elettrodi posti a distanza crescente rispetto alla barra di stimolazione e indicati con la stessa lettera mostrata nell'inserito. g: ciascuna fila riproduce immagini ottenute da una singolastimolazione, nei quattro intervalli di tempo, indicati sopra ciascuna colonna. La FR in ciascuna immagine e' rappresentata secondo la mappa di colori (vedi sezione Metodi)\_riportata a destra della figura.

Figura 4: Filtraggio passa banda della coltura neuronale. a,b: Profilo e sua trasformata di Fourier in risposta alla stimolazione nell'intervallo di tempo tra 1 e 6 msec. I punti rossi sono i punti sperimentali riportati in Fig. 2. La linea continua da eq (1) con  $\sigma$  e  $\rho$  uguali a 890 e 0 rispettivamente. c,d: come in a,b ma nell'intervallo di tempo tra 4 e 9 msec. La curva in c è ottenuta dall'eq (1) con  $\sigma$  e  $\rho$  uguali a 1240 e 0 rispettivamente. e,f: risposta all'impulso e sua



trasformata di Fourier ottenute come differenza tra a e c e tra b e d rispettivamente. In a,c,e nelle ascisse è usata la stessa unità arbitraria (a.u.). Similmente in b,d,f. In b,d,ed e,  $F1(k)$  e  $F2(k)$  sono la trasformata di Fourier della corrispondente Gaussiana in a,c; con  $k$  uguale a  $2\pi/\lambda$ , dove  $\lambda$  è la lunghezza dell'onda spaziale della trasformazione Fourier. g,h: pannelli di sinistra: filtraggio passa banda della coltura neuronale delle due immagini binarie, composte da una barra orizzzzontale (-) e una L, rispettivamente, ottenute sottraendo la AFR nell'intervallo di tempo di 1-6 e 5-10 msec; pannelli di destra: filtraggio digitale ottenuto convolvendo l'immagine binaria originale con la differenza delle due Gaussiane mostrate nel pannello e. Le barre sottili indicano gli elettrodi stimolati. La codificazione del colore come descritta nella sezione Metodi è riprodotta alla destra della figura. i,l: filtraggio passa basso di due differenti immagini a 8 bits. Pannelli di sinistra: immagini originali a 8 bits. Pannelli centrali: filtraggio passa basso delle immagini, ottenuto con le colture neuronali. Pannelli di destra: filtraggio passa basso delle immagini, ottenuto da una convoluzione digitale dell'immagine originale a 8 bits, con il profilo Gaussiano mostrato in 4a. La codifica del colore come descritta nella sezione Metodi è riprodotta a destra della figura.

## METODI

### Preparazione della coltura dei neuroni

I neuroni primari da ippocampo di ratti Wistar di 3giorni, sono ottenuti essenzialmente come descritto<sup>32</sup>. La dissezione viene fatta in 200  $\mu$ M acido kynurenico e 25  $\mu$ M 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) (Sigma, St. Louis, MO) in ghiaccio. Le cellule vengono dissociate meccanicamente facendo passare i frammenti di ippocampo per 20-30 volte attraverso una punta Gilson blu. Il

terreno di coltura e' il minimal essential medium (MEM) con sali di Earle e Glutamax I (Life Technologies, Gaithersburg, MD), con aggiunta di 5% di siero bovino fetale, 7 mg/ml D-glucosio, 3.6 mg/ml HEPES, 0.1 µg/ml biotina, 1.5 µg/ml vitamina B12, 30 µg/ml insulina, e 100 µg/ml transferrina bovina.

Il rivestimento della superficie della MEA con molecole di adesione viene fatto incubando per una notte a 37°C con 1 ml di soluzione di poliornitina alla concentrazione di 50µg/ml di acqua. Le piastre sono successivamente asciugate all'aria. 20 minuti prima della piastratura la superficie della MEA viene ulteriormente coperta con uno strato sottile di Matrigel (Beckton-Dickinson) solo sulla regione della matrice di elettrodi.

100 µl di sospensione cellulare alla concentrazione di  $8 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. è depositata sulla zona degli elettrodi di un MEA priverestito con fattori di adesione. Le cellule sono lasciate a temperatura ambiente per 20 minuti per permetterne la deposizione sul fondo della MEA, quindi viene aggiunto 1 ml del terreno di coltura e la MEA viene incubata in un'atmosfera di 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. La proliferazione di cellule non neurali viene bloccata con l'aggiunta di 2.5-5.0 µM citosina-D-arabinofuranoside dal secondo giorno di coltura in poi. Metà del terreno è cambiato due volte alla settimana. Le registrazioni sono effettuate dalla 3a settimana dopo il piastramento fino a 3 mesi dopo. La stessa piastra può essere utilizzata per le registrazioni elettriche più volte. Durante le registrazioni elettriche, le piastre sono coperte da uno speciale tappo ottenuto da MultiChannelSystem (MCS), che riduce gli scambi gassosi e impedisce l'evaporazione e la contaminazione.

#### Registrazioni elettriche e stimolazione dell'elettrodo

Il sistema commerciale fornito dalla MCS ([www.multichannelsystems.com](http://www.multichannelsystems.com)) è usato per la stimolazione e la registrazione elettrica. I risultati riportati si riferiscono ad una matrice di microelettrodi 6x10, con gli elettrodi distanziati tra loro di 500 micron. Questa matrice viene usata per la stimolazione e la registrazione elettrica.

Attraverso contatti in oro, la matrice di elettrodi è connessa ad un preamplificatore/filtro/amplificatore a 60 canali, la cui ampiezza di banda è 10Hz-3kHz. (MEA 1060-AMP) che riorienta i segnali verso un ulteriore processo elettronico (ad es. amplificazione e conversione AD). Le acquisizioni del segnale sono gestite da un controllo software. Un termostato (HC-X), posto al di sotto del MEA mantiene la temperatura a 37°C. Il MEA fornito da MCS è in grado di digitare in tempo reale a 20 kHz tutte le registrazioni di voltaggio  $V_{ij}$  ottenute dai 60 elettrodi metallici. Un elettrodo è usato come terra (Fig.1c). I dati campionati sono trasferiti in tempo reale ad un disco fisso per un processamento successivo. Ciascun elettrodo metallico può essere usato per la registrazione o per la stimolazione in quanto il sistema MCS non consente un passaggio controllato da computer da stimolazione a registrazione. Le stimolazioni di voltaggio  $S_{ij}$  consistono in impulsi bipolari di durata di 100 msec a ciascuna polarità, per un'ampiezza variante da 200 mV a 1 V, iniettata attraverso il generatore di stimoli STG1004. Un artefatto della durata 5 - 20 msec causato dalla stimolazione elettrica è indotto sugli elettrodi di registrazione. Questo artefatto è rimosso dalle registrazioni elettriche durante le analisi dei dati.

#### Analisi dei dati



I dati acquisiti sono stati analizzati con il software MatLab (The Mathworks, inc.).

*Rimozione dell'artefatto:* L'artefatto a ciascun elettrodo e per ciascun schema di stimolazione è stimato e sottratto dalle registrazioni del voltaggio. L'artefatto è stimato nel seguente modo: per ciascun schema di stimolazione e a ciascun elettrodo la risposta del voltaggio come media di tutte le prove (tipicamente 50) è calcolata e interpolata da 2 polinomi di 9 grado. I due polinomi dispongono i dati in un intervallo di tempo di 0.5-25 ms e 7.5-100 ms dopo la stimolazione. Il primo polinomio è usato per valutare l'artefatto nell'intervallo di tempo da 0.5 a 7.5 msec, mentre il secondo nell'intervallo di tempo da 7.5 e 82.5 msec. L'artefatto, così valutato, è sottratto dal segnale di voltaggio originale.

*Calcolo della frequenza di sparo (firing rate) (FR):*  $V_{ij}$  è il voltaggio registrato all'elettrodo (i,j) e  $\sigma_{ij}$  è la deviazione standard del rumore calcolato in un periodo di almeno 1 sec in cui nessun picco o sparo di neurone è visivamente osservato. Questo indice di frequenza di sparo  $FR_{ij}(t)$  al tempo  $t=(t_1+t_2)/2$  è il numero di tutti gli incroci dei livelli  $V_{ij}$  al di sopra di una soglia fissata a  $5 \cdot \sigma_{ij}$  computata in un intervallo di tempo tra  $t_1$  e  $t_2$ . Questo  $FR_{ij}(t)$  conta gli spari provenienti da differenti neuroni, che fanno un buon contatto elettrico con l'elettrodo (i,j). La  $\sigma_{ij}$  del rumore varia per ciascun elettrodo da 3 a 6  $\mu V$ . L'indice di frequenza di sparo medio  $AFR_{ij}(t)$  è calcolato dalla media di  $FR_{ij}(t)$  di tutte le prove.  $AFR(t)$  è calcolato su un intervallo di 10 msec.

#### Elaborazione dell'immagine

I MEA con almeno più di 56 elettrodi che forniscono registrazioni elettriche di picchi o spari chiari sono usate per l'elaborazione dell'immagine. Data

un'immagine  $I_{ij}$  di  $N \times N$  pixels ed un MEA con  $N \times N$  elettrodi, il livello di grigio di un pixel  $(i,j)$  di  $I$  è convertito in un appropriata stimolazione di voltaggio  $S_{ij}$  dell'elettrodo  $(i,j)$ . Il MEA fornisce i segnali di voltaggio  $V_{ij}$  composti da potenziali di azione o spari prodotti dai neuroni. Il processamento dell'immagine  $I_{ij}$  è il set di risultati  $\dot{F}R_{ij}(t)$ , cosicché a tempi differenti  $t$ , c'è un differente processamento dell'immagine originale  $I_{ij}$ .

*Mappaggio  $I_{ij}$  in  $S_{ij}$ .* Sia  $V_{1/2}$  la stimolazione di voltaggio che evoca la metà della AFR massimale 10 msec dopo l'impulso di voltaggio. Se  $I_{ij}$  è un'immagine binaria, ad es. se i suoi livelli di grigio sono sia 0 che 1, allora  $S_{ij}$  sarà  $3/2 * V_{1/2}$  se  $I_{ij}$  è 1, 0 nell'altro caso. Se  $I_{ij}$  è un'immagine a 2 bits, ad es. se i suoi livelli di grigio sono 0, 1, 2 o 3, allora  $S_{ij}$  sarà 0 se  $I_{ij}$  è 0,  $S_{ij}$  sarà  $1/2 * V_{1/2}$  se  $I_{ij}$  è 1,  $S_{ij}$  sarà  $V_{1/2}$  se  $I_{ij}$  è 2 e  $S_{ij}$  sarà  $3/2 * V_{1/2}$  se  $I_{ij}$  è 3.

*Riempimento di elettrodi silenti e lisciamento.* Quando un elettrodo  $(i,j)$  è silente, cioè quando non si registra alcun picco o sparo, il buco corrispondente nell'immagine processata è riempito assegnando a  $FR_{ij}(t)$  il valore ottenuto calcolando la frequenza di sparo medio degli elettrodi confinanti - ad es. elettrodi a una distanza di  $\approx 500 \mu m$ .  $FR_{ij}(t)$  degli elettrodi stimolati è determinato attraverso l'estrapolazione dagli elettrodi attivi confinanti usando la eq(1). Tutte le immagini che sono state processate ed elaborate dalla coltura neuronale avevano al massimo 3 elettrodi silenti, incluso quello usato come terra. Di conseguenza si usavano solo colture su MEA in cui quasi tutti gli elettrodi erano funzionanti. Spesso, il valore di  $FR_{ij}(t)$  è stato lisciato arrotondato il suo valore facendo la media sugli elettrodi confinanti  $(i-1,j)$ ,  $(i+1,j)$ ,  $(i,j-1)$  e  $(i,j+1)$ .

*Processamento di immagini a 8 bits.* Le immagini a 8 bits  $I_8(x,y)$  sono scomposte come:

$$\sum_{i=1}^8 I_{i1}(x,y) 2^{(i-1)}$$

dove  $I_{i1}(x,y)$  è un'immagine a 1 bit, o

$$\sum_{i=1}^4 I_{i2}(x,y) 2^{2(i-1)}$$

dove  $I_{i2}(x,y)$  è un'immagine a 2 bits. Le 8 immagini  $I_{i1}(x,y)$  a 1 bit o le 4 immagini  $I_{i2}(x,y)$  a 2 bit sono processate come descritte sopra e il loro risultato è sommato come descritto in eq (4).

*Risultato della codifica del colore.* Le immagini processate  $FR_{ij}(t)$ ,  $AFR_{ij}(t)$ , o la loro combinazione (per filtraggio passa basso e/o processamenti a 8 bits) sono mostrate usando una procedura standard di codifica del colore: per immagini filtrate passa basso, i valori di  $FR_{ij}(t)$  o  $AFR_{ij}(t)$  sono normalizzati ad avere valori tra 0 e 1 dividendo per il valore corrispondente massimale tra tutti gli elettrodi nell'intervallo di tempo 0-25 ms e la mappa di colore (di 256 colori) è normalizzata tra -1 e 1. Per immagini filtrate passa banda ottenute come differenza di  $FR_{ij}(t)$  o  $AFR_{ij}(t)$  a due tempi differenti - il risultato derivante è normalizzato tra -1 e +1, dividendo per il suo valore assoluto massimo e la corrispondente mappa di colore (di 256 colori) è normalizzata tra -1 e 1. La codifica del colore di immagini filtrate digitalmente è ottenuta con la normalizzazione dei valori di intensità tra -1 e 1 ed una simile codifica del colore. Pertanto, con questa codifica, il processamento delle immagini a 1,2 o 8-bits ha la medesima mappa, cioè il risultato ha 256 colori differenti. Se desiderato si può utilizzare una diversa codifica.

## RISULTATI

I MEA con 60 o più elettrodi possono essere ottenuti da centri di ricerca o acquistati commercialmente. I MEA sono fabbricati con diverse geometrie di elettrodi, tra cui una griglia quadrata regolare con spazi tra gli elettrodi che variano da 50 a 500  $\mu\text{m}$ . Gli elettrodi individuali sono solitamente coperti da un sottile strato di platino e hanno forma quadrata con lati da 10 a 30  $\mu\text{m}$ . La grande maggioranza dei MEA disponibili attualmente e le matrici di pixels per camere CCD condividono la stessa geometria di una griglia quadrata. Questa osservazione ha ispirato il disegno di un dispositivo per la elaborazione di immagini dove l'elemento di computo è una coltura di neuroni cresciuta su una base MEA: l'immagine è mappata allo stimolo voltaico di una coltura di neuroni e l'attività elettrica evocata è presa come segnale di uscita del nuovo dispositivo.

#### Descrizione dettagliata del dispositivo.

Un'immagine di  $I_{ij}$  of  $N \times N$  pixels (Fig. 1a) con l'usuale geometria quadrata è codificata nel segnale di entrata di un MEA con  $N \times N$  elettrodi (Fig. 1b), così che il livello di grigio di pixel  $(i,j)$  di  $I_{ij}$  è convertito in una appropriata stimolazione di voltaggio  $S_{ij}$  dell'elettrodo  $(i,j)$  (si vedano i Metodi per una descrizione dettagliata di questa codifica). Il segnale di uscita del dispositivo è composto dai segnali di voltaggio  $V_{ij}$  registrati con il MEA (Fig. 1c). Questi segnali sono composti da potenziali di azione o spari prodotti dai neuroni nella coltura (mostrato nell'inserito del pannello b), e le loro statistiche sono usate per ottenere una codifica dell'immagine processata. Più specificatamente, il segnale di uscita del dispositivo è  $FR_{ij}(t)$ , cioè la frequenza di sparo di tutti i neuroni registrati all'elettrodo  $(i,j)$  nel intervallo di tempo tra  $t - \Delta t$  e  $t + \Delta t$ , successivo alla stimolazione dell'elettrodo al tempo 0. In questo modo, per



ciascuna stimolazione  $S_{ij}$  codificante per l'immagine  $f_{ij}$ , si ottiene una serie di segnali di uscita  $FR_{ij}(t)$  rappresentanti l'elaborazione di  $f_{ij}$  al tempo  $t$ .

In quello che segue sarà mostrato che una coltura di neuroni da ippocampo di ratto (vedi Metodi) può essere usata per ottenere un filtraggio passa basso e passa banda di immagini digitali.

L'intervallo dinamico, il tempo di ciclo e la riproducibilità della risposta del dispositivo proposto sono stati analizzati stimolando una fila di elettrodi del MEA con lo stesso impulso di voltaggio. Questa stimolazione corrisponde ad un'immagine nera con una barra sottile chiara. Sono stati usati brevi voltaggi bipolari che durano 200  $\mu$ sec e la loro ampiezza è stata progressivamente aumentata da 300 mV to 900 mV. I picchi registrati da un elettrodo aumentavano in frequenza e spesso apparivano picchi di forma diversa, prodotti da un differente neurone (Fig. 1d). La frequenza di sparo media (AFR) di tutti i picchi rilevati (vedi Metodi) aumenta con la stimolazione del voltaggio (Fig. 1e). L'intervallo dinamico della AFR, tuttavia, era piuttosto stretto: solitamente nessun picco era evocato con impulsi di voltaggio al di sotto di 200 mV e, una risposta massimale saturante era evocata con un voltaggio di stimolazione di circa 1 V. Nella grande maggioranza degli esperimenti è stato possibile distinguere in modo affidabile quattro livelli di attività evocata, indicanti che la coltura neuronale può codificare 2 bit.

Per determinare il tempo del ciclo del dispositivo, la stessa stimolazione è stata ripetuta ad intervalli da 100 msec a 10 secondi. Usando un intervallo maggiore di 1 o 2 secondi tra stimolazioni successive, la AFR aveva due componenti: uno, evocato con un ritardo di pochissimi msec e di circa 15 msec di durata, seguito da un secondo componente di durata di circa 100



msec. L'ampiezza del primo componente non era significativamente influenzata dalla diminuzione del tempo di ripetizione da 10 sec a 0.1 msec (Fig. 1f). L'ampiezza del secondo componente era significativamente diminuita a brevi tempi di ripetizione ed era stabile per tempi di ripetizione superiori ai 4 secondi. Pertanto, il nuovo dispositivo può processare 2 bits con un tempo di ciclo che varia da 0.25 a 10 Hz, a seconda se è considerato il primo o il secondo componente nella risposta.

La coltura neuronale cresciuta sul MEA costituisce un network bidimensionale e le sue proprietà di filtraggio sono meglio analizzate utilizzando una lunga barra come stimolo spaziale. In questo modo, data una coltura omogenea, la caratterizzazione di un network bidimensionale è ridotta alla comprensione di un problema monodimensionale molto più semplice: i sei elettrodi della fila superiore sono stati usati per la stimolazione e la AFR evocata nei nove elettrodi della stessa colonna è stata misurata.

Nei primi momenti, come ad esempio nell'intervallo di tempo tra 1 e 6 msec (Fig 2a) l'AFR evocato decade spazialmente attraversando la coltura neuronale come una funzione Gaussiana con una deviazione standard  $\sigma$  di  $890 \mu\text{m}$ , corrispondente a 1.8 pixels. Nell'intervallo di tempo tra 4 e 9 msec (Fig 2b) l'attività elettrica decade con una funzione Gaussiana simile ma con una  $\sigma$ , corrispondente a  $1240 \mu\text{m}$  corrispondente a 2.5 pixels. Dopo circa 10 msec il picco dell'AFR evocata si allontana dagli elettrodi stimolati ed è descritta come una funzione Gaussiana centrata ad una distanza  $p$  dagli elettrodi stimolati corrispondente a 2.5 pixels. Dopo ulteriori 10 msec il picco dell'AFR evocata si muove dagli elettrodi stimolati (Fig 2d). Il processamento della coltura neuronale dell'immagine  $f_{ij}$  composta da una barra chiara di 6

pixels nella parte superiore è rappresentata dall' immagine codificante la FR, come mostrato nei pannelli e, f, g, h. Nei pannelli i e j sono mostrate le convoluzioni digitali dell' immagine iniziale  $f_{ij}$  con un kernel Gaussiano con una deviazione standard  $\sigma$  di 1.8 e di 2.5 pixels rispettivamente. Nei pannelli i e j sono mostrate le convoluzioni a tempi successivi di 9.5 e 14.5 msec.  $FR_{ij}(t)$  nei pannelli g e h rispettivamente è uno spostamento del filtraggio passa basso dell'immagine originale.

Gli esperimenti dove una fila (o una colonna) di elettrodi, o elettrodi individuali, sono stimolati indicano che il processamento spaziale-temporale della coltura neuronale è descritto da una risposta di impulso radiale.

$$h(\rho, \sigma, t) = A(t) \exp((\rho - \rho(t)) / 2 \sigma(t)^2) \quad \rho^2 = x^2 + y^2 \quad (1)$$

cioè una usuale funzione Gaussiana usuale, centrata su  $\rho(t)$  e con una varianza  $\sigma^2(t)$  che varia nel tempo. Pertanto, data un'immagine a 2 bit  $I_2\text{bit}(x, y)$ , la risposta di uscita del dispositivo varia con il tempo ed è:

$$FR(x, y, t) = I_2\text{bit}(x, y) ** h(\rho, \sigma, t)$$

in cui  $\rho$  e  $\sigma$  dipendono dal tempo e  $**$  indica una convoluzione bidimensionale.

L'immagine in Fig.2k, ottenuta per convoluzione di  $f_{ij}$  con il kernel (1) avente i valori di  $1250 \mu\text{m}$  e  $850 \mu\text{m}$  per  $\rho$  e  $\sigma$  rispettivamente, mostra le stesse caratteristiche di quelle in Fig.2g che rappresenta il filtraggio neuronale osservato sperimentalmente.

Diversamente dagli strumenti in silicio, i neuroni biologici sono affetti da un significativo rumore ed è pertanto essenziale valutare l'affidabilità del dispositivo proposto. La Fig.3a mostra tre differenti risposte elettriche alla stessa stimolazione: il numero dei picchi o spari evocati era leggermente

variabile, ma i primi picchi o spari evocati avvenivano con una variabilità molto piccola di circa 1 msec.

Al picco della risposta evocata, il coefficiente di variazione (CV) della frequenza di sparo  $p$ , calcolato su una finestra di 10 msec - era sempre piccolo, circa 0.2. Alla fine il CV aumentava fino a circa 1 e anche più. Con finestre più larghe di 50 msec, il CV era sempre inferiore a 0.5. Il CV della risposta evocata non si modificava in modo significativo con la distanza dell'elettrodo di registrazione dal sito della stimolazione (Fig. 3c,d,e,f). La Figura 3g illustra le immagini ottenute in singoli esperimenti o prove - senza essere mediati - quando la fila superiore degli elettrodi è stimolata con lo stesso impulso di voltaggio di 600 mV. All'inizio (prima e seconda colonna) le immagini processate erano abbastanza simili. Dopo i primi 15 msec, le immagini processate differiscono da prova a prova, in accordo con l'alto CV delle registrazioni elettriche. Questi dati mostrano che immediatamente dopo la stimolazione del voltaggio c'è una "buona" finestra temporale durante la quale l'elaborazione della coltura neuronale è riproducibile, dando luogo ad un computo affidabile.

Dato il filtraggio spazio-temporale di eq (1), durante i primi millisecondi successivi alla stimolazione elettrica è possibile attuare molto velocemente un filtraggio passa basso e passa banda di un'immagine. Nell'intervallo di tempo di 1-6 msec, la risposta all'impulso della coltura neuronale è una funzione Gaussiana con un  $\sigma$  di circa 890  $\mu\text{m}$  (Fig. 4a), ma 2 o 3 msec più tardi il valore di  $\sigma$  aumenta a 1240  $\mu\text{m}$  (vedi fig 4c), i due filtri sono passa basso (vedi la loro densità di frequenza di energia nei pannelli 4b e 4d), ma la loro differenza (Fig. 4e) è a passa banda (Fig 4f). Il filtro passa banda delle



immagini binarie rappresentanti caratteri semplici come un - e L ottenuta con la coltura neuronale sono mostrate nelle Fig. 4g,h. Il confronto con lo stesso filtro effettuata da un computer digitale mostra che il dispositivo opera come desiderato.

La coltura neuronale può essere utilizzata anche per elaborare immagini digitali a 8 bits. Si consideri  $I_8(x,y)$  come un'immagine con livelli grigi di 8 bits nella posizione  $(x,y)$ . Allora  $I_8(x,y)$  può essere scomposta come:

$$I_8(x,y) = \sum_{i=1}^{8/m} I_{mi}(x,y) 2^{m(i-1)} \quad (3)$$

dove  $I_{mi}(x,y)$  è una quantità con 1 o 2 bits (con  $m$  uguale rispettivamente quindi a 1 o 2). Data questa scomposizione, la elaborazione di un'immagine a

8 bits è ottenuto come:

$$\sum_{i=1}^{8/m} I_{mi} 2^{m(i-1)} ** h(\rho, \sigma, t) \quad (4)$$

Elaborando con la coltura neuronale, indipendentemente, le 4 immagini a 2 bits o le 8 immagini a 1 bit, si ottiene un filtraggio passa basso o passa banda di un'immagine a 8 bits, come quella mostrata nella Fig. 4i. I, pannelli di sinistra. Un filtraggio passa basso delle immagini originali a 8 bit, ottenute dalla coltura neuronale e dal filtraggio digitale con una funzione Gaussiana, sono mostrate nei pannelli di centro e di destra, rispettivamente. La alta similarità dell'immagine nel pannello di centro e di destra mostra che il dispositivo proposto può processare anche immagini a 8 bits.

E' pertanto dimostrato che, crescendo colture neuronali su multi electrode arrays (MEA), si ottiene un nuovo dispositivo di computo composto da neuroni biologici ed elettrodi metallici. I due maggiori vantaggi di questo dispositivo sono: prima di tutto, un filtraggio passa basso e passa banda può essere

ottenuto in meno di 10 msec, indipendentemente dalla dimensione dell'immagine da processare. Come conseguenza il dispositivo è potenzialmente in grado di processare ampie immagini digitali (2000 x 2000 pixels) più velocemente della maggior parte dei computer digitali noti; in secondo luogo, l'uso dei neuroni biologici come strumenti di computo apre una nuove prospettive nelle quali l'informatica e l'ingegneria dei calcolatori può attingere dall'esperienza e dalla tecnologia della biologia cellulare e dell'ingegneria genetica.

L'utilità del dispositivo proposto dipende dalla dimensione del processamento parallelo. Il dispositivo proposto non è conveniente per la elaborazione di piccole immagini, le quali possono essere accuratamente elaborate da computer digitali standard. Diventa utile, fornendo migliori prestazioni dei computer digitali, quando devono essere processate immagini grandi con più di 1000x1000 pixels. Il processamento di queste immagini, tuttavia, richiede lo sviluppo di MEA con più di 1 milione di elettrodi. Inoltre, lo sviluppo di MEA con un numero molto alto di elettrodi e la soluzione di tutti i problemi di interfaccia, l'uso efficiente del neurocomputer richiede anche un appropriato quadro di computo. I neuroni biologici sono lenti e non molto affidabili come elementi di computo, ma lavorano naturalmente in parallelo. Sono ideali per la soluzione di problemi di parallelismo massivo, quando l'affidabilità di un singolo elemento di computo non è critica. I neuroni biologici e probabilmente tutti i neurocomputer non sono in grado di imitare una macchina Turing<sup>20</sup>, cioè un dispositivo di computo seriale e preciso. Una delle maggiori attrazioni dei neurocomputer è la possibilità di usare la intrinseca adattabilità dei neuroni biologici, derivati da milioni di anni di evoluzione. La possibilità di sfruttare il

potenziamento (LTP)<sup>21</sup> e la depressione (LTD)<sup>22</sup> a lungo termine nelle colture neuronali fornisce una naturale implementazione di algoritmi elaborati per reti neurali artificiali (ANN)<sup>23-24</sup>. E' anche possibile usare la tecnologia delle cellule staminali<sup>25-27</sup> per ottenere popolazioni di neuroni con proprietà specifiche e rilascianti neurotrasmettitori selezionati così da avere colture neuronali con rapporti controllati di neuroni inibitori ed eccitatori, possibilmente anche con un'affidabilità più alta degli elementi di computo individuali. La possibilità di direzionare la crescita dei neuroni lungo direzioni spaziali specifiche<sup>28-30</sup> consentirà la fabbricazione di un'ampia varietà di filtri spaziali, imitando le proprietà recettive di campo di neuroni nelle aree visive <sup>31</sup>.

Il dispositivo ha una programmabilità limitata. Il calcolo rappresentato dal dispositivo può essere controllato da differenti chimici aggiunti al mezzo extracellulare ma non è verosimile ottenere la versatilità dei soliti computer digitali.

Questo dispositivo è destinato ad essere alla base di una nuova generazione di strumentazione di calcolo, sviluppato dalla sinergia della scienza dei materiali e della biologia cellulare. Questi mezzi di calcolo sembrano avere caratteristiche simili a quelle degli esseri umani come l'apprendimento e l'adattabilità.

#### Bibliografia

1. Chen, J., et al. Large On-Off Ratios and Negative Differential Resistance in a Molecular Electronic Device. *Science* **286**, 1550-1552 (1999).
2. Collier C. P., et al. Electronically Configurable Molecular-Based Logic Gates. *Science* **285**, 391-394 (1999).

3. Collier, C. P., et al., A [2]Catenane-Based Solid State Electronically Reconfigurable Switch. *Science* **289**, 1172 (2000).
4. Lee, I., Lee, J., & Greenbaum, E. Biomolecular Electronics: Vectorial Arrays of Photosynthetic Reaction Centers. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 3294 (1997).
5. Reed M. A., et al. Conductance of a Molecular Junction, *Science* **278**, 252-254. (1997).
6. Roth K. M. et al., Molecular approach toward information storage based on the redox properties of porphyrins in self-assembled monolayers, *J. Vac. Sci. Tech. B* **18**, 2359 (2000).
7. Marr. Vision: A Computational Investigation into the Human Representation and Processing of Visual Information. San Francisco. CA:Freeman & Co., (1982)
8. Rumelhart, D. E. and J. L. McClelland. Explorations in Parallel Distributed Processing. MIT Press. Cambridge, Massachusetts. (1988)
9. Nicholls J.G., et al. From Neuron to Brain: A Cellular and Molecular Approach to the Function of the Nervous System 4TH edition. Sinauer Associates, Incorporated (2000)
10. Shadlen MN, Newsome WT (1994) Noise, neural codes and cortical organization. *Curr Opin Neurobiol* **4**: 569-579
11. Zoccolan D, G. Pinato & Torre V. Highly variable spike trains underlie reproducible sensory-motor responses in the medicinal leech. *J Neurosci.* (in press ) (2002).
12. Gross, G.W., et al. A new fixed-array multimicroelectrode system designed for longterm monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neurosci. Lett.* **6**, 101-105(1977)



13. Pine, J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. Neurosci. Methods*, **2**, 19-31 (1980)
14. Novak, J.L. & Wheeler, B.C. Recording from the aplysia abdominal ganglion with a planar microelectrode array. *IEEE Trans, Biomed. Eng.* **33** 196-202 (1986)
15. Jimbo Y. & Kawana A. Electrical stimulation and recording from cultured neurons using a planar electrode array, *Bioelectrochem. Bioenergetics* **29**, 193-204 (1992)
16. Martinoia, S., et al. A general purpose system for long-term recording from a microelectrode array coupled to excitable cells. *J. Neurosci. Methods* **48**, 115-121 (1993)
17. Vassanelli, S., & Fromherz, P., Neurons from Rat Brain coupled to Transistors. *Applied Physics A* **65**, 85-88 (1997)
18. Zeck, G., & Fromherz, P. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**, 10457-10462 (2001).
19. Bonifazi, P., & Fromherz, P. Silicon Chip for Electronic Communication between Nerve Cells by Noninvasive Interfacing and Analog-Digital Processing. *Advanced Materials* **14**, 1190-1193 (2002)
20. Cutland, N. Computability, Cambridge University Press, (1980).
21. Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361** 31-39 (1993).
22. Linden, D.J. & Conner, J.A. Long-term synaptic depression. *Ann. Rev. Neurosci.* **18**, 319-357 (1995).



23. Introduction to the Theory of Neural Computation, Hertz J., Krogh A., Palmer R.G., (Santa Fe Institute Studies in the Sciences of Complexity. Lecture Notes, Vol 1) (1991).
24. Hopfield, J.J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2554-2558(1982).
25. Lee, S.H., et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* **18**, 675-9 (2000).
26. Kawasaki, H., et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **99**, 1580-5 ( 2002).
27. Westmoreland, J.J. Hancock, C.R. and Condie, B.G. Neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* **284**, 674-80 (2001).
28. Chang, J.C., Brewer, G.J. & Wheeler, B.C. Modulation of neural network activity by patterning. *Biosensors & Bioelectronics* **16** 527-533 (2001)
29. Nakamura, F., Kalb, R.G., & Strittmatter, S.M. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J. Neurobiol.* **44**, 219-229 (2000).
30. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133 (1996).
31. Hubel DH, Wiesel TN. Early exploration of the visual cortex. *Neuron*, **20**, 401-412 (1998).
32. Malgaroli, A. & Tsien, R.W. Glutamate-induced long term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* **257**, 134-139 (1992).



OLGA CAPASSO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)

*Olga Capasso*

## RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo per la mappatura e il processamento in parallelo di immagini comprendente almeno una base "multi electrode array" MEA, su cui è cresciuta una coltura omogenea di cellule neuronali, in cui detta base MEA è in grado di stimolare e registrare l'attività elettrica di dette cellule neuronali.

2. Metodo per il processamento in parallelo di un immagine digitale comprendente le seguenti fasi:

a) mappatura di una immagine digitale ( $I_{1,2}(x,y)$ ) (INPUT) con 1 o 2 bit di risoluzione ( $I_1(x,y)$  o  $I_2(x,y)$  a seconda che si abbia un'immagine rispettivamente di 1 o 2 bit) di  $N \times N$  pixel in impulsi di voltaggio di 2 o 4 livelli di intensità applicati ad una matrice  $N \times N$  di elettrodi integrati su un piattino (MEA) su cui sono mantenute in coltura cellule neuronali connesse spontaneamente fra loro a formare una rete;

b) elaborazione dell'immagine da parte della coltura neuronale con il nucleo o kernel di convoluzione:

$$h(\rho, \sigma, t) = A(t) \exp((\rho - \rho(t)) / 2 \sigma(t)^2) \quad (1)$$

$$\rho^2 = x^2 + y^2$$

c) registrazione dell'attività elettrica della coltura neuronale a mezzo di registrazione con la matrice di multielettrodi dei segnali elettrici (in voltaggio) extracellulari e rivelazione, per ogni singolo elettrodo e in successivi intervalli di tempo, dei segnali o spari associati alla generazione dei potenziali di azione dei neuroni in coltura.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui si registra la frequenza di sparo  $FR(x,y,t)$  (OUTPUT) misurata dall'elettrodo in posizione  $(x,y)$  ed in un intervallo di tempo centrato in  $t$ .

4. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui INPUT ed OUTPUT sono legati fra loro dall'equazione:

$$FR(x,y,t) = I_{1,2}(x,y) ** h(\rho,\sigma,t) \quad (2)$$

dove \*\* indica una convoluzione bidimensionale.

5. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui, se l'immagine digitale in INPUT è definita con 8 bit ( $I_8(x,y)$ ), essa viene scomposta alternativamente in 4 o 8 immagini rispettivamente da 2 o 1bit ( $I_{mi}$ ) dove m è uguale rispettivamente a 2 o 1 secondo l'equazione:

$$I_8(x,y) = \sum_{i=1}^{8/m} I_{mi} 2^{m(i-1)} \quad (3)$$

ed ogni singola immagine  $I_{mi}$  viene processata indipendentemente e poi ricomposta in una unica immagine ad 8 bit, in cui l'intero processo (scomposizione, filtraggio, ricomposizione) è descritto dall'equazione:

$$\sum_{i=1}^{8/m} I_{mi} 2^{m(i-1)} ** h(\rho,\sigma,t) \quad (4)$$

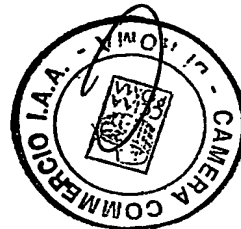
il cui risultato finale è l'immagine  $I_8(x,y)$  processata con una risoluzione ad 8 bit.

Roma,

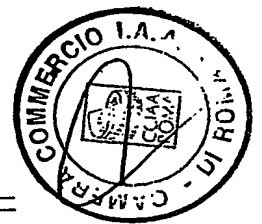
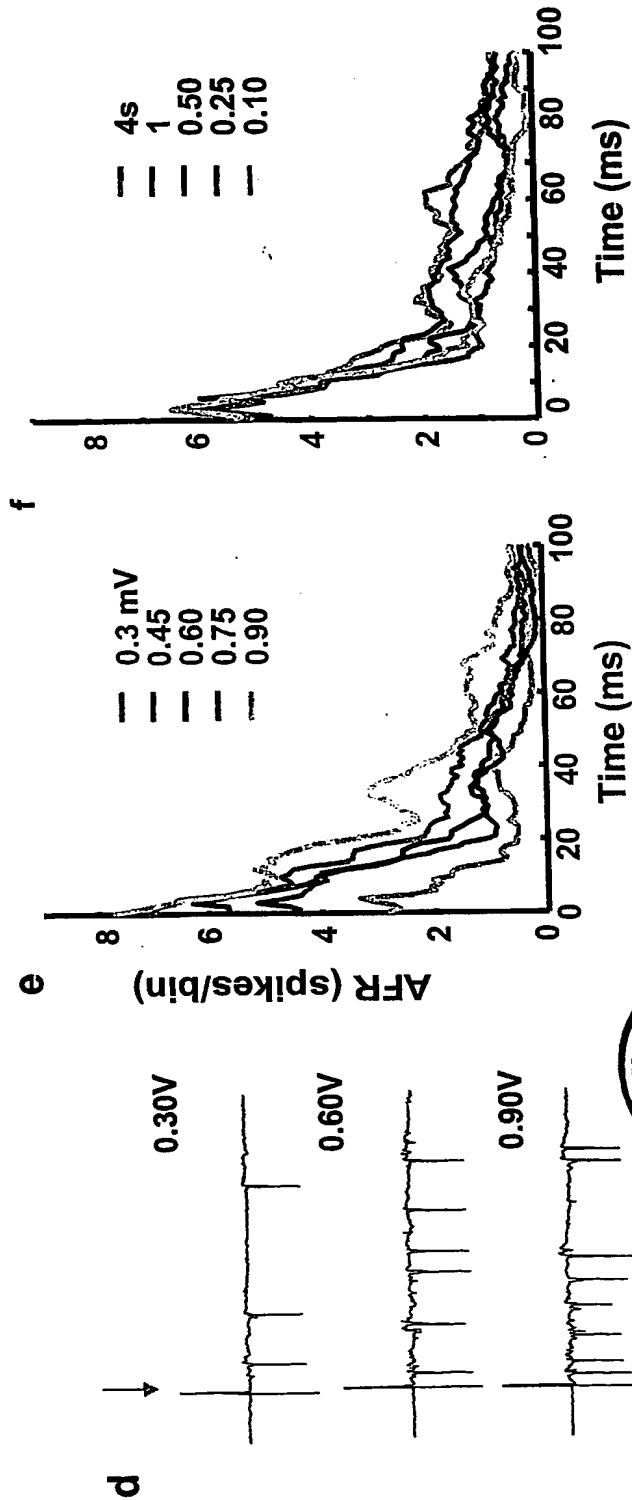
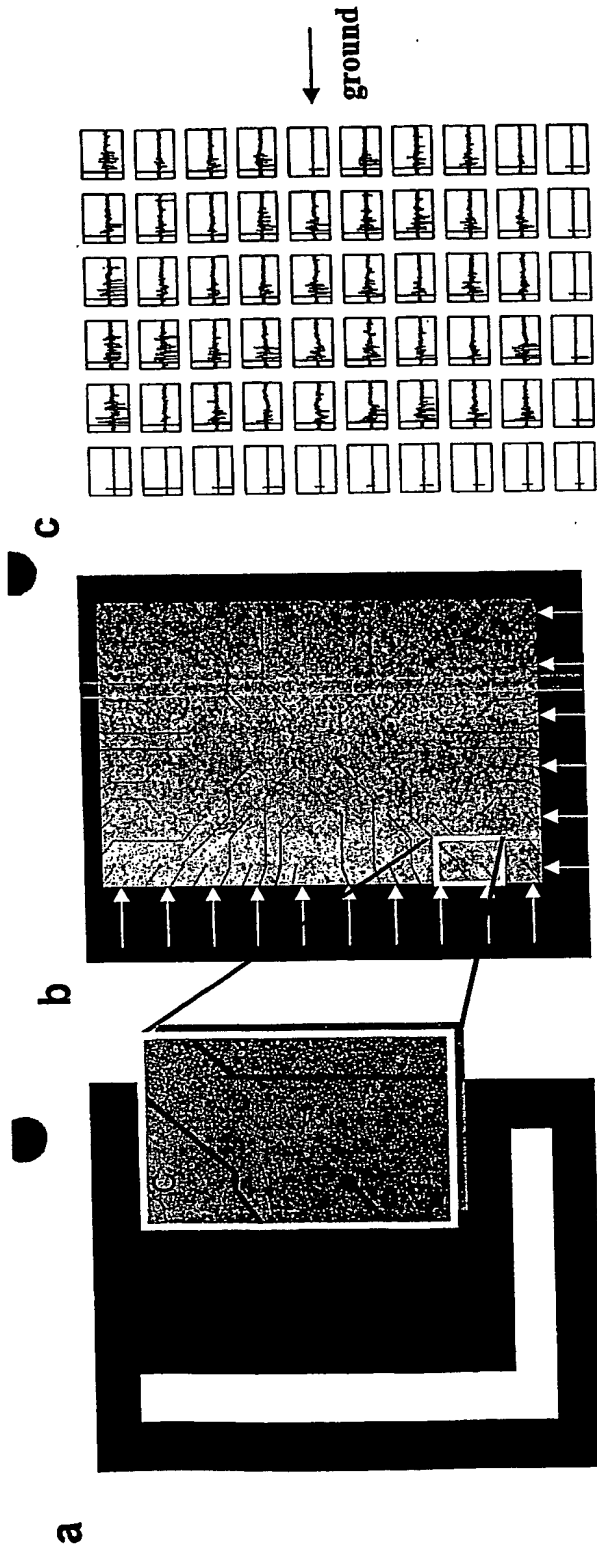
p.p. S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

DE SIMONE & PARTNERS S.p.A. (OC)

*Olga Capasso*  
UN MANDATARIO  
per sé e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



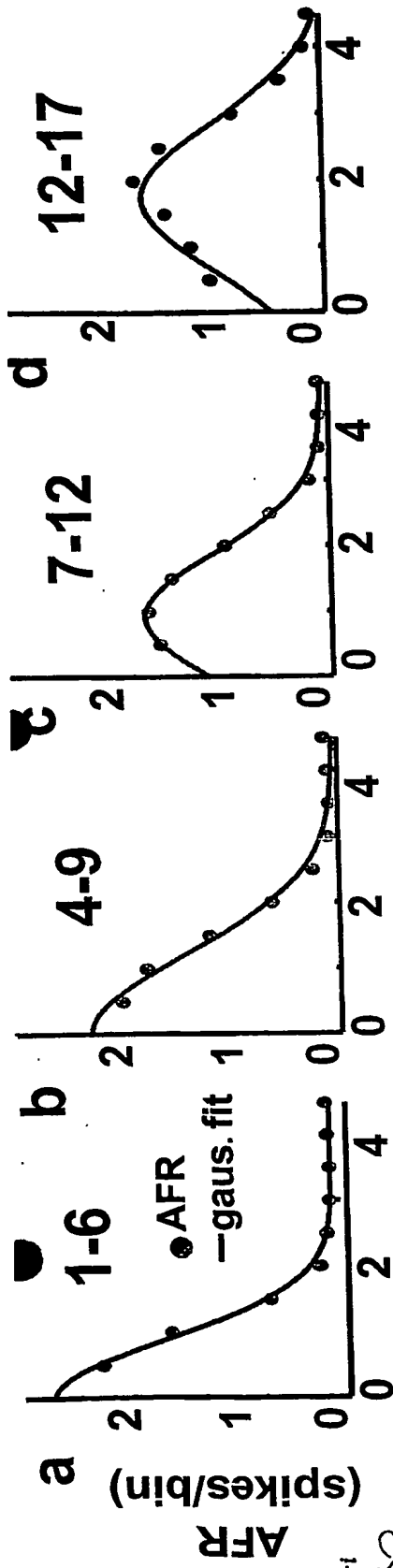
RM 2002 A 000604



UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
Data del 12/05/2002

Figura 1

RM 2002 A 000604<sup>a</sup>

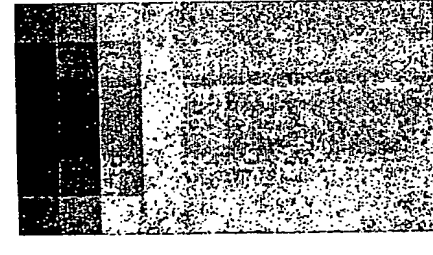
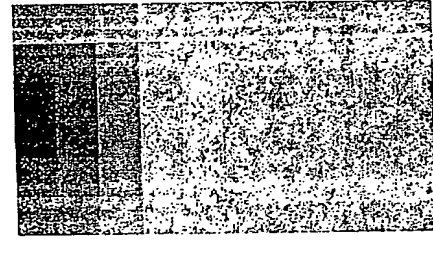
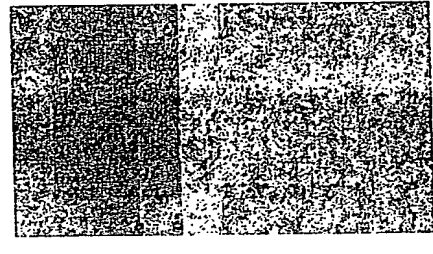
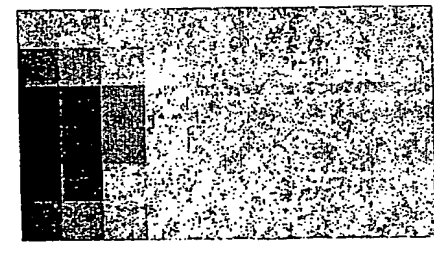
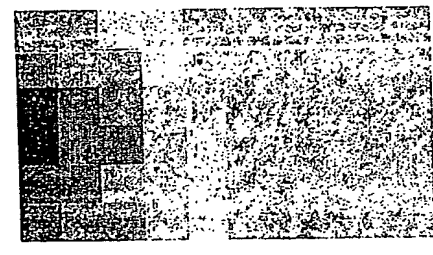
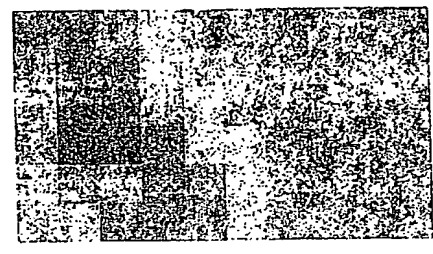
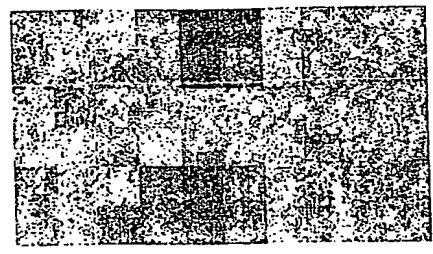


UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
*[Signature]*  
(n° d'iscr. 620 B)  
Fig. 2

Neuronal  
filtering

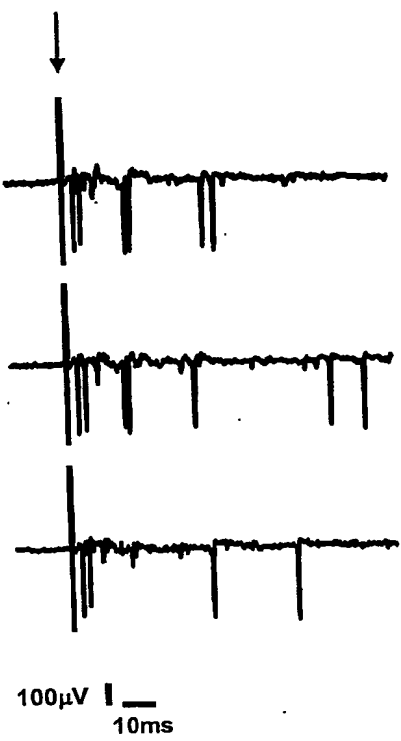


Digital  
filtering

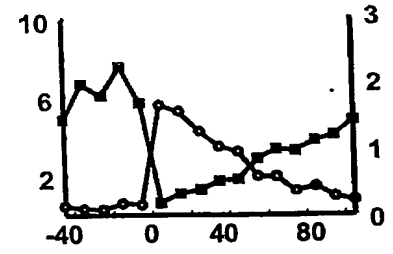
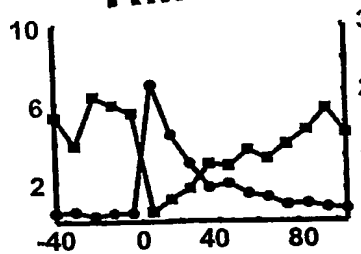


RM 2002cA 000604

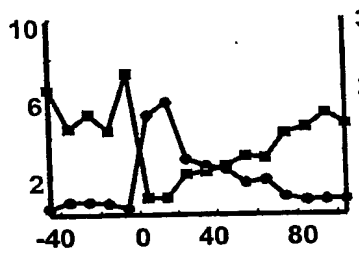
a



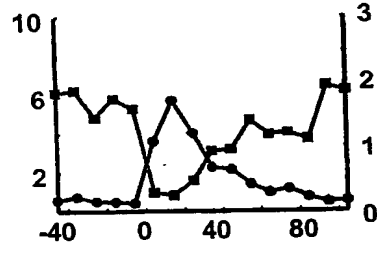
b



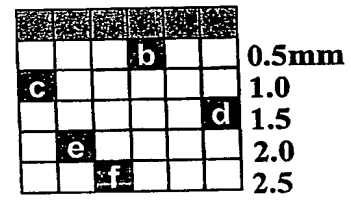
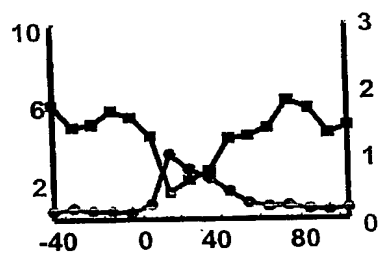
d



e



f



g

Single sweep images

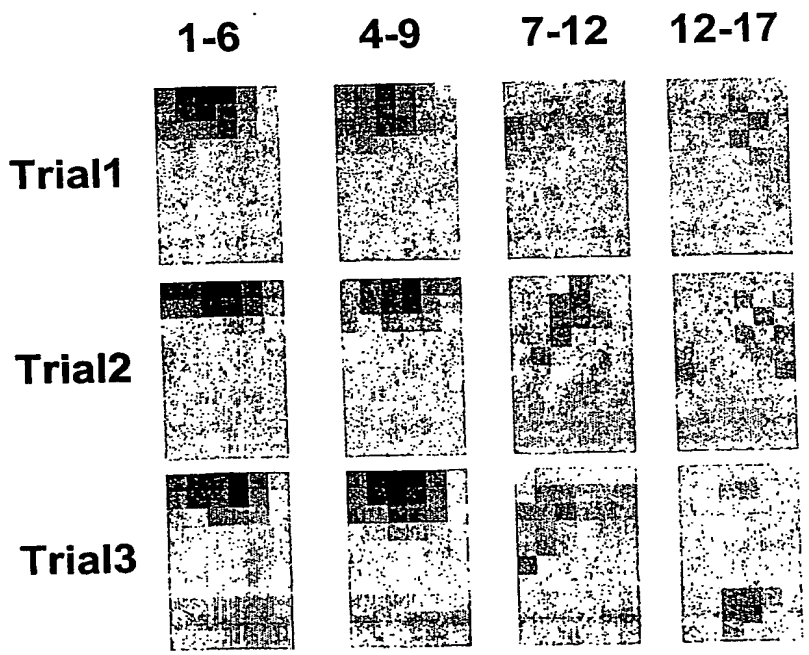
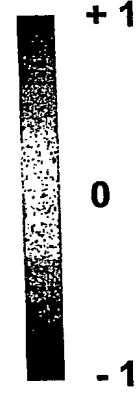


Figura 3

*Olga Capasso*  
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Olga Capasso  
(N° d'iscr. 820 B)



RM 2002 A 000604

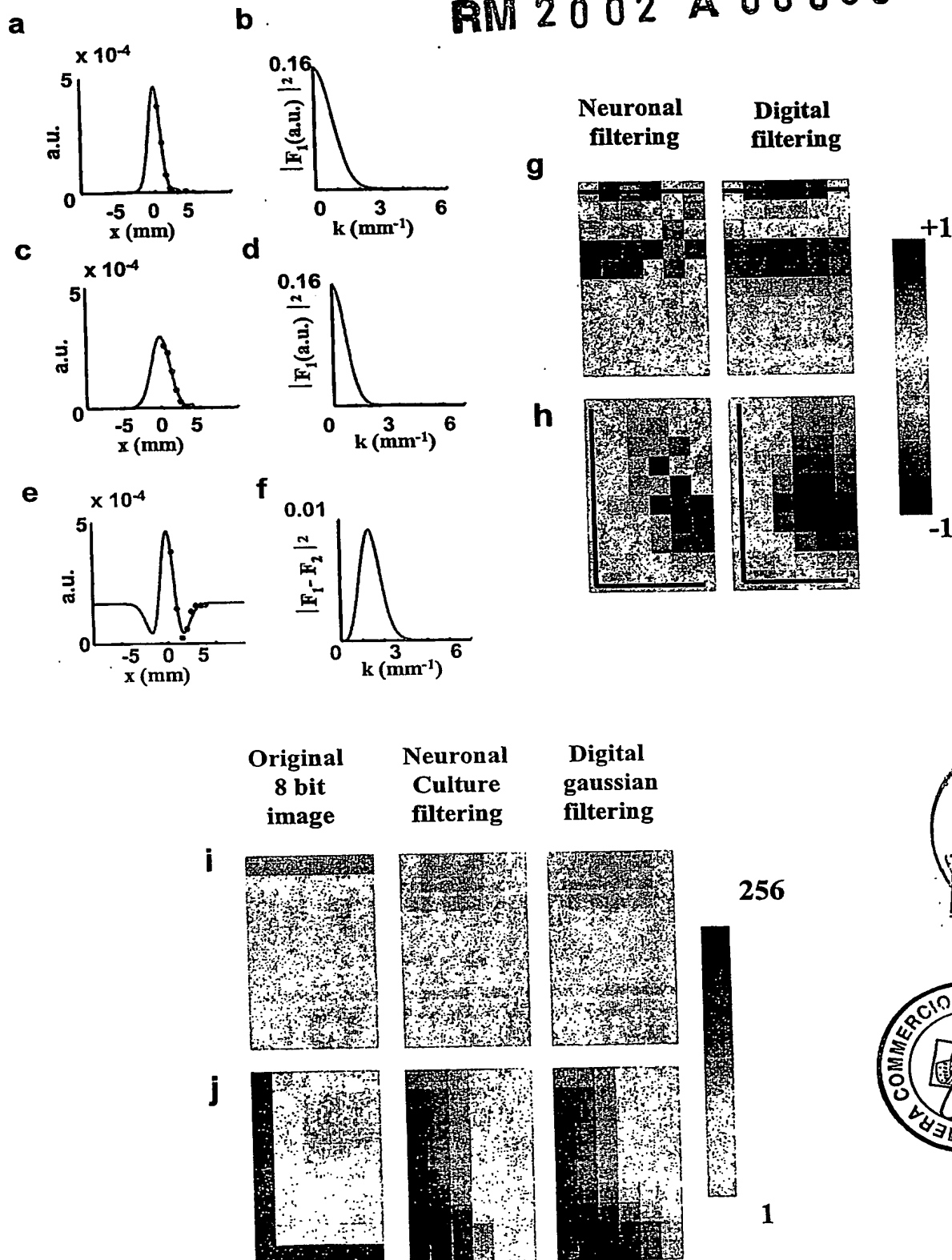


Figura 4

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
della Camera  
(N° d'ist. 820 B)